

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets

(11)



EP 0 770 622 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:

02.05.1997 Patentblatt 1997/18

(51) Int. Cl.⁶: C07K 7/64, A61K 38/04

(21) Anmeldenummer: 96113972.2

(22) Anmeldetag: 31.08.1996

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU NL
PT SE

Benannte Erstreckungsstaaten:

LT LV SI

(30) Priorität: 15.09.1995 DE 19534177

(71) Anmelder: MERCK PATENT GmbH
64293 Darmstadt (DE)

(72) Erfinder:

- Jonczyk, Alfred, Dr.
64295 Darmstadt (DE)

- Goodman, Simon, Dr.
64287 Darmstadt (DE)
- Diefenbach, Beate, Dr.
64289 Darmstadt (DE)
- Sutter, Arne, Dr.
64297 Darmstadt (DE)
- Hölzmann, Günter, Dr.
64342 Seeheim (DE)
- Kessler, Horst, Prof.
85748 Garching (DE)
- Dechantsreiter, Michael
85748 Garching (DE)

(54) Cyclische Adhäsionsinhibitoren

(57) Die Erfindung betrifft neue Cyclopeptide der Formel Cyclo-(nArg-nGly-nAsp-nD-nE) worin

sowie deren physiologisch unbedenklichen Salze.

D und E jeweils unabhängig voneinander Gly, Ala, β-Ala, Asn, Asp, Asp(OR), Arg, Cha, Cys, Gln, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Lys(Ac), Lys(NH₂), Lys(ASH), Met, Nal, Nle, Orn, Phe, 4-Hal-Phe, homoPhe, Phg, Pro, Pya, Ser, Thr, Tia, Tic, Trp, Tyr oder Val, wobei die genannten Aminosäurereste auch derivatisiert sein können,

Diese Verbindungen wirken als Integrin-Inhibitoren und können insbesondere zur Prophylaxe und Behandlung von Erkrankungen des Kreislaufs, angiogenen Erkrankungen, mikrobiellen Infektionen und in der Tumorthерапie verwendet werden.

R Alkyl mit 1-18 C-Atomen,

Hal F, Cl, Br, I,

Ac Alkanoyl mit 1-10 C-Atomen, Aroyl mit 7-11 C-Atomen oder Aralkanoyl mit 8-12 C-Atomen,

n keinen Substituenten oder einen Alkylrest R, Benzyl oder einen Aralkyl-Rest mit 7-18 C-Atomen an der alpha-Aminofunktion des entsprechenden Aminosäurerestes bedeuten, mit der Bedingung, daß mindestens ein Aminosäurerest über eine Substituenten n verfügt und wobei, sofern es sich um Reste optisch aktiver Aminosäuren und Amino-säurederivate handelt, sowohl die D- als auch die L-Formen eingeschlossen sind,

EP 0 770 622 A2

Da die Verbindungen der Formel I Inhibitoren der Fibrinogenbindung und damit Liganden der Fibrinogenrezeptoren auf Blutplättchen darstellen, können sie als Diagnostika zur Detektion und Lokalisierung von Thromben im vaskulären System *in vivo* verwendet werden, sofern sie durch einen isotopenmarkierten oder UV-detektierbaren Rest substituiert werden. Im bildgebenden Verfahren können auch Tumore mit ihnen detektiert und lokalisiert werden (Tumorimaging; PET).

Die Verbindungen der Formel I können als Inhibitoren der Fibrinogenbindung auch als wirksame Hilfsmittel zum Studium des Metabolismus von Blutplättchen in unterschiedlichen Aktivierungsstadien oder von intrazellulären Signalmechanismen des Fibrinogenrezeptors verwendet werden. Die detektierbare Einheit eines einzubauenden "Labels", z.B. Biotinyl, erlaubt es, nach Bindung an den Rezeptor, genannte Mechanismen zu untersuchen.

Die Verbindungen haben also die Eigenschaft, die Bindung natürlicher oder künstlicher Liganden an Integrine, speziell der Integrine $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ und $\alpha_{IIb}\beta_3$, aber auch von $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_6$ und $\alpha_v\beta_8$ zu inhibieren.

Sie haben zudem noch den Vorteil zum Stand der Technik, daß durch N-Alkylierung einer oder mehrerer Peptidbindungen eine metabolische Stabilisierung und erhöhte Fettlöslichkeit erreicht wird. Durch die Reduzierung der möglichen Wasserstoffbrücken, denn N-Alkyl kann kein H-Donor für C=O sein, verbessert sich die Penetrationsfähigkeit durch Membranen, so daß eine erhöhte orale Resorbierbarkeit erhalten werden kann, zu dem kann eine gesteigerte Plasmaproteinbindung auftreten.

Die N-Alkylierung der Peptidbindung steigert die inhibitorische Potenz der Verbindungen und erhöht die Selektivität der Inhibitierung in bezug auf bestimmte Integrine. Insbesondere durch die Position und die Anzahl der N-Alkyl-Gruppen kann die Selektivität beeinflußt werden.

Die Verbindungen können als Arzneimittelwirkstoffe in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzt werden, insbesondere zur Prophylaxe und zur Behandlung von Erkrankungen des Kreislaufs, Thrombose, Herzinfarkt, Arteriosklerose, Entzündungen, Apoplexie, Angina pectoris, Tumorerkrankungen, osteolytischen Erkrankungen, insbesondere Osteoporose, Angiogenese und durch Angiogenese bedingte Erkrankungen, wie z.B. der diabetischen Retinopathie des Auges, makularer Degeneration, Myopie, okularer Histoplasmose, rheumatischer Arthritis, Osteoarthritis, rubrotischem Glaukom, aber auch ulcerativen Colitis, Morbus Crohn, Multiple Sklerose, Psoriasis sowie Restenose nach Angioplastie. Ferner können die Verbindungen zur Verbesserung und Unterstützung von Wundheilungsprozessen bei mikrobiellen Infekten und bei akutem Nierenversagen eingesetzt werden.

Diese Wirkungen können z.B. mit Hilfe von literaturbekannten Methoden, wie sie z.B. von P.C. Brooks et al. in Cell. 79, 1157-1164 (1994) oder Science 264, 569-571 (1994) beschrieben werden, nachgewiesen werden.

Die vor- und nachstehend aufgeführten Abkürzungen von Aminosäureresten stehen für die Reste folgender Aminosäuren:

Abu	4-Aminobuttersäure
Aha	6-Aminohexansäure
35 Ala	Alanin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
Asp(OR)	Asparaginsäure (β -ester)
Arg	Arginin
40 Cha	3-Cyclohexylalanin
Cit	Citrullin
Cys	Cystein
Dab	2,4-Diaminobuttersäure
Dap	2,3-Diaminopropionsäure
45 Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
His	Histidin
Ile	Isoleucin
50 Leu	Leucin
Lys	Lysin
Lys(Ac)	N ^ε -Alkanoyllysin
Lys(AcNH ₂)	N ^ε -Aminoalkanoyllysin
Lys(AcSH)	N ^ε Mercaptoalkanoyllysin
55 Met	Methionin
Nal	3-(2-Naphthyl)-alanin
Nle	Norleucin
Orn	Ornithin
Phe	Phenylalanin

- Z -nArg-nGly-nAsp-nD-nE-
 -nGly-nAsp-nD-nE-nArg-
 -nAsp-nD-nE-nArg-nGly-
 -nD-nE-nArg-nGly-nAsp- oder
 5 -nE-nArg-nGly-nAsp-nD- bedeutet,

oder ein reaktionsfähiges Derivat eines solchen Peptids mit einem cyclisierenden Mittel behandelt,
 oder daß man ein Cyclopeptid, welches an sich der Formel I entspricht, aber über eine oder mehrere freie Aminogruppen, Säuregruppen und/oder aktivierte α -C-Atome verfügt, durch Alkylierung, Acylierung oder Veresterung derivatisiert
 10 und/oder daß man eine basische oder saure Verbindung der Formel I durch Behandeln mit einer Säure oder Base in eines ihrer Salze überführt.

Vor- und nachstehend haben die Reste D, E und n die bei den Formeln I und II angegebenen Bedeutungen, sofern nicht ausdrücklich etwas anderes angegeben ist. Die verwendeten Buchstaben für die jeweiligen Reste stehen in keinem Zusammenhang mit dem Einbuchstaben-Code für Aminosäuren.

15 In den vorstehenden Formeln steht Alkyl vorzugsweise für Methyl, Ethyl, Isopropyl, n-Butyl, sec.-Butyl oder tert.-Butyl.

Die Gruppe D ist vorzugsweise Phe, auch bevorzugt D-Phe, aber auch 4-Hal-Phe, besonders 4-L-Phe sowie Trp, Tyr, homo-Phe, Nal oder Phg, wobei die D-Formen auch gleichermaßen bevorzugt sind.

E ist vorzugsweise ein hydrophober Aminosäurerest, insbesondere Gly, Ala, Val, Leu, Nle oder Ile. Die Variable n steht vorzugsweise für N-Methyl-, N-Ethyl-, N-Propyl-, N-Benzyl- oder N-Isopropyl-substituierte α -Aminogruppen im Peptid, wobei mehrere Aminosäurereste mit gleichen oder unterschiedlichen Alkyresten N-substituiert sein können.

Dementsprechend sind Gegenstand der Erfindung insbesondere diejenigen Verbindungen der Formel I, in denen mindestens einer der genannten Reste eine der vorstehend angegebenen bevorzugten Bedeutungen hat.

Eine bevorzugte Gruppe von Verbindungen kann durch die Teilformel Ia ausgedrückt werden, die sonst der Formel I entspricht, worin jedoch

D D-Phe, Phe, D-Trp, Trp, D-Tyr, Tyr, D-homoPhe, homoPhe, D-Nal, Nal, D-Phg, Phg oder 4-Hal-Phe (D- oder L-Form) und

30 E Val, Gly, Ala, Leu, Ile oder Nle

bedeuten.

Eine weitere bevorzugte Gruppe von Verbindungen kann durch die Teilformel Ib ausgedrückt werden, die sonst der Formel I entspricht, worin jedoch

35 D D-Phe und

E Gly, Ala, Val, Leu, Ile oder Nle

40 bedeuten,

und einer der Aminosäurereste Arg, Gly oder Asp an der α -Aminogruppe einen Alkyllsubstituenten aufweist.

Eine weitere bevorzugte Gruppe von Verbindungen kann durch die Teilformel Ic ausgedrückt werden, die den Teilformeln Ia und Ib sowie der Formel I entspricht, worin jedoch einer der Aminosäurereste D oder E an der α -Aminogruppe alkyliert ist.

45 Ferner sind alle physiologisch verträglichen Salze der unter die Teilformeln Ia, Ib und Ic fallenden Verbindungen besonders bevorzugt.

Die Verbindungen der Formel I und auch die Ausgangsstoffe zu ihrer Herstellung werden im übrigen nach bekannten Methoden hergestellt, wie sie in der Literatur (z.B. in den Standardwerken wie Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart) beschrieben sind, und zwar unter Reaktionsbedingungen, die für die genannten Umsetzungen bekannt und geeignet sind. Dabei kann man auch von bekannten, hier nicht näher erwähnten Varianten Gebrauch machen.

Die Ausgangsstoffe können, falls erwünscht, auch *in situ* gebildet werden, so daß man sie aus dem Reaktionsgemisch nicht isoliert, sondern sofort weiter zu den Verbindungen der Formel I umsetzt.

55 Die Verbindungen der Formel I können erhalten werden, indem man sie aus ihren funktionellen Derivaten durch Solvolyse, insbesondere Hydrolyse, oder durch Hydrogenolyse in Freiheit setzt.

Bevorzugte Ausgangsstoffe für die Solvolyse bzw. Hydrogenolyse sind solche, die anstelle einer oder mehrerer freier Amino- und/oder Hydroxygruppen entsprechende geschützte Amino- und/oder Hydroxygruppen enthalten, vorzugsweise solche, die anstelle eines H-Atoms, das mit einem N-Atom verbunden ist, eine Aminoschutzgruppe tragen, z.B. solche, die der Formel I entsprechen, aber anstelle einer NH₂-Gruppe eine NHR'-Gruppe (worin R' eine Amino-

oder 2-Ethoxy-N-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin, in einem inerten Lösungsmittel, z.B. einem halogenierten Kohlenwasserstoff wie Dichlormethan, einem Ether wie Tetrahydrofuran oder Dioxan, einem Amid wie DMF oder Dimethylacetamid, einem Nitril wie Acetonitril, oder in Gemischen dieser Lösungsmittel, bei Temperaturen zwischen etwa -10 und 40, vorzugsweise zwischen 0 und 30°. Um die intramolekulare Cyclisierung vor der intermolekularen Peptid-Bindung zu fordern, ist es zweckmäßig, in verdünnten Lösungen zu arbeiten (Verdünnungsprinzip).

Anstelle von II können auch geeignete reaktionsfähige Derivate dieser Stoffe in die Reaktion eingesetzt werden, z.B. solche, in denen reaktive Gruppen intermediär durch Schutzgruppen blockiert sind. Die Aminosäurederivate II können z.B. in Form ihrer aktivierten Ester verwendet werden, die zweckmäßig in situ gebildet werden, z.B. durch Zusatz von HOEt oder N-Hydroxysuccinimid.

Die Ausgangsstoffe der Formel II sind in der Regel neu. Sie können nach bekannten Methoden, z.B. den oben angegebenen Methoden der Peptidsynthese und der Abspaltung von Schutzgruppen, hergestellt werden.

In der Regel synthetisiert man zunächst geschützte Pentapeptidester der Formel R'-Z-OR'', z.B. BOC-Z-O Me oder BOC-Z'-OEt, die zunächst zu Säuren der Formel R'-Z-OH, z.B. BOC-Z-OH verseift werden; aus diesen wird die Schutzgruppe R' abgespalten, wodurch man die freien Peptide der Formel H-Z-OH (II) erhält.

Die Derivatisierung eines Cyclopeptides, welches an sich einer Verbindung der Formel I entspricht, erfolgt ebenfalls über an sich bekannte Methoden, wie sie für die Alkylierung von Aminen, die Veresterung von Carbonsäuren oder die nucleophile Substitution an aliphatischen C-Atomen bekannt und in jedem Lehrbuch der Organischen Chemie, z.B. J. March, Adv. Org. Chem., John Wiley & Sons N.Y. (1985), beschrieben sind.

Eine Base der Formel I kann mit einer Säure in das zugehörige Säureadditionssalz übergeführt werden. Für diese

Umsetzung kommen insbesondere Säuren in Frage, die physiologisch unbedenkliche Salze liefern. So können anorganische Säuren verwendet werden, z.B. Schwefelsäure, Salpetersäure, Halogenwasserstoffsäuren wie Chlorwasserstoffsäure oder Bromwasserstoffsäure, Phosphorsäuren wie Orthophosphorsäure, Sulfaminsäure, ferner organische Säuren, insbesondere aliphatische, alicyclische, araliphatische, aromatische oder heterocyclische ein- oder mehrbaige Carbon-, Sulfon- oder Schwefelsäuren, z.B. Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Pivalinsäure, Diethylessigsäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Pimelinsäure, Fumarsäure, Maleinsäure, Milchsäure, Weinsäure, Äpfelsäure, Benzoesäure, Salicylsäure, 2- oder 3-Phenylpropionsäure, Citronensäure, Gluconsäure, Ascorbinsäure, Nicotinsäure, Isonicotinsäure, Methan- oder Ethansulfonsäure, Ethandsulfonsäure, 2-Hydroxyethansulfonsäure, Benzolsulfonsäure, p-Toluolsulfonsäure, Naphthalin-mono- und -disulfonsäuren, Laurylschwefelsäure. Salze mit physiologisch nicht unbedenklichen Säuren, z.B. Pikrate, können zur Isolierung und/oder Aufreinigung der Verbindungen der Formel I verwendet werden.

Andererseits kann eine Säure der Formel I durch Umsetzung mit einer Base in eines ihrer physiologisch unbedenklichen Metall- oder Ammoniumsalze übergeführt werden. Als Salze kommen dabei insbesondere die Natrium-, Kalium-, Magnesium-, Calcium- und Ammoniumsalze in Betracht, ferner substituierte Ammoniumsalze, z.B. die Dimethyl-, Diethyl- oder Diisopropylammoniumsalze, Monoethanol-, Diethanol- oder Triethanolammoniumsalze, Cyclohexyl-, Dicyclohexylammoniumsalze, Dibenzylethylendiammoniumsalze, weiterhin z.B. Salze mit N-Methyl-D-glucamin oder mit Arginin oder Lysin.

Die neuen Verbindungen der Formel I und ihre physiologisch unbedenklichen Salze können zur Herstellung pharmazeutischer Präparate verwendet werden, indem man sie zusammen mit mindestens einem Träger- oder Hilfsstoff und, falls erwünscht, zusammen mit einem oder mehreren weiteren Wirkstoff(en) in eine geeignete Dosierungsform bringt. Die so erhaltenen Zubereitungen können als Arzneimittel in der Human- oder Veterinärmedizin eingesetzt werden. Als Trägersubstanzen kommen organische oder anorganische Stoffe in Frage, die sich für die enterale (z.B. orale oder rektale), parenterale (z.B. intravenöse Injektion) oder lokale (z.B. topische, dermale, ophthalmische oder nasale) Applikation oder für eine Applikation in Form eines Inhalations-Sprays eignen und mit den neuen Verbindungen nicht reagieren, beispielsweise Wasser oder wässrige isotonische Kochsalzlösung, niedere Alkohole, pflanzliche Öle, Benzylalkohole, Polyethylenglykole, Glycerintriacetat und andere Fettsäureglyceride, Gelatine, Sojalecithin, Kohlehydrate wie Lactose oder Stärke, Magnesiumstearat, Talk, Cellulose, Vaseline. Zur oralen Anwendung dienen insbesondere Tabletten, Dragees, Kapseln, Sirupe, Säfte oder Tropfen; von Interesse sind speziell Lacktabletten und Kapseln mit magensaftresistenten Überzügen bzw. Kapselhüllen. Zur rektalen Anwendung dienen Suppositorien, zur parenteralen Applikation Lösungen, vorzugsweise ölige oder wässrige Lösungen, ferner Suspensionen, Emulsionen oder Implantate. Zur topischen Anwendung eignen sich z.B. Lösungen, die in Form von Augentropfen verwendet werden können, ferner z.B. Suspensionen, Emulsionen, Cremes, Salben oder Komprimate. Für die Applikation als Inhalations-Spray können Sprays verwendet werden, die den Wirkstoff entweder gelöst oder suspendiert in einem Treibgas oder Treibgasgemisch (z.B. CO₂ oder Fluorchlorkohlenwasserstoffsatzstoffe) enthalten. Zweckmäßig verwendet man den Wirkstoff dabei in mikronisierter Form, wobei ein oder mehrere zusätzliche physiologisch verträgliche Lösungsmittel zugegen sein können, z.B. Ethanol. Inhalationslösungen können mit Hilfe üblicher Inhalatoren verabfolgt werden. Die neuen Verbindungen können auch lyophilisiert und die erhaltenen Lyophilisate z.B. zur Herstellung von Injektionspräparaten verwendet werden. Die Injektionen können dabei als Bolus oder als kontinuierliche Infusion (z.B. intravenös, intramuskulär, subcutan oder intrathecal) gegeben werden. Die angegebenen Zubereitungen können sterilisiert sein und/oder Hilfsstoffe wie Konservierungs-, Stabilisierungs- und/oder Netzmittel, Emulgatoren, Salze zur Beeinflussung

sorb® RP select B (7 µm)-250 × 4 mm-Säule, Eluent A: 0,3 % TFA in Wasser; Eluent B: 0,3 % TFA in 2-Propanol/Wasser (8:2) Gradient 1-99 % B in 50 Min. bei 1 ml/Min. Fluß und Detektion bei 215 nm. M⁺ = Molekular-Peak im Massenspektrum, erhalten nach der "Fast Atom Bombardment"-Methode (FAB).

5 **Beispiel 1**

- Eine Lösung von 0,6 g H-NMe-Arg(Mtr)-Gly-Asp(OBut)-D-Phe-Val-ONa [z.B. erhältlich aus Fmoc-NMe-Arg(Mtr)-Gly-Asp(OBut)-D-Phe-Val-O-Wang, wobei -O-Wang den bei den modifizierten Merrifield-Techniken verwendeten Rest eines 4-Oxymethyl-phenoxy-methyl-polystyrolharzes bedeutet, durch Abspaltung der Fmoc-Gruppe mit Piperidin/DMF und Abspaltung des Harzes mit TFA/CH₂Cl₂ (1:1)] in 15 ml DMF wird mit 85 ml Dichlormethan verdünnt und mit 50 mg NaHCO₃ versetzt. Nach Kühlung in einer Trockeneis/Aceton-Mischung werden 40 µl Diphenylphosphorylazid zugegeben. Nach 16 Stunden Stehen bei Raumtemperatur engt man die Lösung ein. Das Konzentrat wird gelfiltriert (Sephadex G10-Säule in Isopropanol/Wasser 8:2) und dann wie üblich mittels HPLC gereinigt. Man erhält nach Behandlung mit TFA/H₂O (98:2) Cyclo-(NMe-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val); RZ = 18,1; FAB-MS (M+H): 589.
- 10 Analog erhält man durch Cyclisierung der entsprechenden linearen Peptide und Abspaltung der Schutzgruppen:
- Cyclo-(Arg-NMeGly-Asp-DPhe-Val); RZ = 17,9; FAB-MS (M + H): 589;
 Cyclo-(Arg-Gly-NMeAsp-DPhe-Val); RZ = 18,3; FAB-MS (M + H): 589;
 Cyclo-(Arg-Gly-NMeAsp-DPhe-Val) x TFA; RZ = 15,4; FAB-MS (M + H): 589;
- 20 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-NMeDPhe-Val); RZ = 18,9; FAB-MS (M + H): 589;
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal); RZ = 19,5; FAB-MS (M + H): 589;
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeLys); RZ = 11,1; FAB-MS (M + H): 618;
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeLys(benzoyloxycarbonyl)) x TFA; RZ = 23,4; FAB-MS (M + H): 752;
- 25 Cyclo-(NEtArg-Gly-Asp-DPhe-Val); FAB-MS (M + H): 603;
 Cyclo-(Arg-NEtGly-Asp-DPhe-Val); FAB-MS (M + H): 603;
 Cyclo-(Arg-Gly-NEtAsp-DPhe-Val); FAB-MS (M + H): 603;
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-NEtDPhe-Val); FAB-MS (M + H): 603;
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NEtVal); FAB-MS (M + H): 603;
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe(4-l)-NMeVal); RZ = 23,5; FAB-MS (M + H): 715;
- 30 Cyclo-(NPrArg-Gly-Asp-DPhe-Val); FAB-MS (M + H): 617;
 Cyclo-(Arg-NPrGly-Asp-DPhe-Val); FAB-MS (M + H): 617;
 Cyclo-(Arg-Gly-NPrAsp-DPhe-Val); FAB-MS (M + H): 617;
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-NPrDPhe-Val); FAB-MS (M + H): 617;
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NPrVal); FAB-MS (M + H): 617;
- 35 Cyclo-(NBzIArg-Gly-Asp-DPhe-Val); FAB-MS (M + H): 665;
 Cyclo-(Arg-NBzIGly-Asp-DPhe-Val); FAB-MS (M + H): 665;
 Cyclo-(Arg-Gly-NBzIAsp-DPhe-Val); FAB-MS (M + H): 665;
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-NBzIDPhe-Val); FAB-MS (M + H): 665;
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NBzIVal); FAB-MS (M + H): 665;
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-Phe-DNMeVal) x TFA; RZ = 18,2; FAB-MS (M + H): 589;
- 40 Cyclo-(NMeArg-Gly-Asp-DPhe-Leu); FAB-MS (M + H): 603;
 Cyclo-(Arg-NMeGly-Asp-DPhe-Leu); FAB-MS (M + H): 603;
 Cyclo-(Arg-Gly-NMeAsp-DPhe-Leu); FAB-MS (M + H): 603;
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-NMeDPhe-Leu); FAB-MS (M + H): 603;
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeLeu); FAB-MS (M + H): 603;
- 45 Cyclo-(NEtArg-Gly-Asp-DPhe-Leu); FAB-MS (M + H): 617;
 Cyclo-(Arg-NEtGly-Asp-DPhe-Leu); FAB-MS (M + H): 617;
 Cyclo-(Arg-Gly-NEtAsp-DPhe-Leu); FAB-MS (M + H): 617;
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-NEtDPhe-Leu); FAB-MS (M + H): 617;
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NEtLeu); FAB-MS (M + H): 617;
- 50 Cyclo-(NPrArg-Gly-Asp-DPhe-Leu); FAB-MS (M + H): 631;
 Cyclo-(Arg-NPrGly-Asp-DPhe-Leu); FAB-MS (M + H): 631;
 Cyclo-(Arg-Gly-NPrAsp-DPhe-Leu); FAB-MS (M + H): 631;
- 55 Cyclo-(NPrArg-Gly-Asp-DPhe-Leu); FAB-MS (M + H): 631;
 Cyclo-(Arg-NPrGly-Asp-DPhe-Leu); FAB-MS (M + H): 631;
 Cyclo-(Arg-Gly-NPrAsp-DPhe-Leu); FAB-MS (M + H): 631;

Cyclo-(Arg-NMeGly-Asp-Phg-Val);
 Cyclo-(Arg-Gly-NMeAsp-Phg-Val);
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-NMePhg-Val);
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-Phg-NMeVal);
 Cyclo-(NEtArg-Gly-Asp-Phg-Val);
 Cyclo-(Arg-NEtGly-Asp-Phg-Val);
 Cyclo-(Arg-Gly-NEtAsp-Phg-Val);
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-NEtPhg-Val);
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-Phg-NEtVal);
 Cyclo-(NPrArg-Gly-Asp-Phg-Val);
 Cyclo-(Arg-NPrGly-Asp-Phg-Val);
 Cyclo-(Arg-Gly-NPrAsp-Phg-Val);
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-NPrPhg-Val);
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-Phg-NPrVal);
 Cyclo-(NBzIArg-Gly-Asp-Phg-Val);
 Cyclo-(Arg-NBzIGly-Asp-Phg-Val);
 Cyclo-(Arg-Gly-NBzIAsp-Phg-Val);
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-NBzIPhg-Val);
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-Phg-NBzIVal);
 Cyclo-(NMeArg-Gly-Asp-Trp-Val);
 Cyclo-(Arg-NMeGly-Asp-Trp-Val);
 Cyclo-(Arg-Gly-NMeAsp-Trp-Val);
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-NMeTrp-Val);
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-Trp-NMeVal);
 Cyclo-(NEtArg-Gly-Asp-Trp-Val);
 Cyclo-(Arg-NEtGly-Asp-Trp-Val);
 Cyclo-(Arg-Gly-NEtAsp-Trp-Val);
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-NEtTrp-Val);
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-Trp-NEtVal);
 Cyclo-(NPrArg-Gly-Asp-Trp-Val);
 Cyclo-(Arg-NPrGly-Asp-Trp-Val);
 Cyclo-(Arg-Gly-NPrAsp-Trp-Val);
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-NPrTrp-Val);
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-Trp-NPrVal);
 Cyclo-(NBzIArg-Gly-Asp-Trp-Val);
 Cyclo-(Arg-NBzIGly-Asp-Trp-Val);
 Cyclo-(Arg-Gly-NBzIAsp-Trp-Val);
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-NBzITrp-Val);
 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-Trp-NBzIVal);

Beispiel 2

Eine Lösung von 0,28 g Cyclo-(Arg(Mtr)-Gly-Asp-NMePhe-DVal) [erhältlich durch Cyclisierung gemäß Bsp. 1] in 8,4 ml TFA, 1,7 ml Dichlormethan und 0,9 ml Thiophenol wird 4 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen, anschließend eingeengt und nach Verdünnen mit Wasser gefriergetrocknet. Gelfiltration an Sephadex G 10 (Essigsäure/Wasser 1:1) und anschließende Reinigung durch präparative HPLC unter den angegebenen Bedingungen liefern Cyclo-(Arg-Gly-Asp-NMePhe-DVal); FAB-MS (M+H): 589.
 Analog erhält man:

aus Cyclo-(Arg(Mtr)-Gly-NMeAsp-DPhe-Ile);
 Cyclo-(Arg-Gly-NMeAsp-DPhe-Ile); FAB-MS (M+H): 603;

Beispiel 4

5 Zur Herstellung von Affinitätsphasen suspendiert man 0,9 g N-Maleinimido-(CH₂)₅-CO-NH-(CH₂)₃-Polymer [erhältlich durch Kondensation von N-Maleinimido-(CH₂)₅-COOH mit H₂N-(CH₂)₃-Polymer] in 10 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer bei pH 7 und fügt bei 4° ein Äquivalent Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeLys(CO(CH₂)₂SH) hinzu. Man röhrt 4 Stunden bei gleichzeitiger Erwärmung der Reaktionsmischung auf Raumtemperatur, filtriert den festen Rückstand ab und wäscht zweimal mit je 10 ml Pufferlösung (pH 7) und anschließend dreimal mit je 10 ml Wasser. Man erhält Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeLys(CO(CH₂)₂S-3-(N-maleinimido-(CH₂)₅-CONH-(CH₂)₃-Polymer)).

10 Beispiel 5

Analog Beispiel 4 erhält man durch Kondensation von Polymer-O-(CH₂)₃-NH₂ [im Handel erhältlich] und Cyclo-(Arg-Gly-Asp-NMe-DPhe-Lys(CO(CH₂)₄COOH) [erhältlich durch Kondensation von Adipinsäure mit Cyclo-(Arg-Gly-Asp-NMe-DPhe-Lys-(CO-(CH₂)₄-CO-NH-(CH₂)₃-O-Polymer)].

Analog erhält man durch Kondensation von

Cyclo-(NMe-Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys-(CO-(CH₂)₅-NH₂)) mit HOOC-CH₂-O-Polymer:

20 Cyclo-(NMe-Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys-(CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH₂-O-Polymer)).

Die nachstehenden Beispiele betreffen pharmazeutische Zubereitungen.

Beispiel A: Injektionsgläser

25 Eine Lösung von 100 g eines Cyclopeptides der Formel I und 5 g Dinatriumhydrogenphosphat in 3 l zweifach destilliertem Wasser wird mit 2 n Salzsäure auf pH 6,5 eingestellt, steril filtriert, in Injektionsgläser abgefüllt, unter sterilen Bedingungen lyophilisiert und steril verschlossen. Jedes Injektionsglas enthält 5 mg Wirkstoff.

30 Beispiel B: Suppositorien

Man schmilzt ein Gemisch von 20 g Wirkstoff der Formel I mit 100 g Sojalecithin und 1400 g Kakaobutter, gießt in Formen und läßt erkalten. Jedes Suppositorium enthält 20 mg Wirkstoff.

35 Beispiel C: Lösung

Man bereitet eine Lösung aus 1 g Wirkstoff der Formel I, 9,38 g NaH₂PO₄ × 2 H₂O, 28,48 g Na₂HPO₄ × 12 H₂O und 0,1 g Benzalkoniumchlorid in 940 ml zweifach destilliertem Wasser. Man stellt auf pH 6,8 ein, füllt auf 1 l auf und sterilisiert durch Bestrahlung. Diese Lösung kann in Form von Augentropfen verwendet werden.

40 Beispiel D: Salbe

Man mischt 500 mg Wirkstoff der Formel I mit 99,5 g Vaseline unter aseptischen Bedingungen.

45 Beispiel E: Tabletten

Ein Gemisch von 100 g eines Cyclopeptids der Formel I, 1 kg Lactose, 600 g mikrokristalliner Cellulose, 600 g Maisstärke, 100 g Polyvinylpyrrolidon, 80 g Talk und 10 g Magnesiumstearat wird in üblicher Weise zu Tabletten gepräßt, so daß jede Tablette 10 mg Wirkstoff enthält.

50 Beispiel F: Dragees

Man preßt Tabletten wie in Beispiel E angegeben und überzieht sie anschließend in üblicher Weise mit einem Überzug aus Saccharose, Maisstärke, Talk, Tragant und Farbstoff.

55 Beispiel G: Kapseln

In üblicher Weise werden Hartgelatinekapseln mit einem Wirkstoff der Formel I gefüllt, so daß jede Kapsel 5 mg Wirkstoff enthält.

-nD-nE-nArg-nGly-nAsp- oder
-nE-nArg-nGly-nAsp-nD- bedeutet,

- 5 oder ein reaktionsfähiges Derivat eines solches Peptids mit einem cyclisierenden Mittel behandelt,
oder daß man ein Cyclopeptid, welches an sich der Formel I entspricht, aber über eine oder mehrere freie Amino-
gruppen, Säuregruppen und/oder aktivierte α -C-Atome verfügt, durch Alkylierung, Acylierung oder Veresterung
derivatisiert,
10 und/oder daß man eine basische oder saure Verbindung der Formel I durch Behandeln mit einer Säure oder Base
in eines ihrer Salze überführt.
- 15 5. Verfahren zur Herstellung pharmazeutischer Zubereitungen, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Verbindung
der Formel I nach Anspruch 1 und/oder eines ihrer physiologisch unbedenklichen Salze zusammen mit mindestens
einem festen, flüssigen oder halbflüssigen Träger- oder Hilfsstoff in eine geeignete Dosierungsform bringt.
- 20 6. Pharmazeutische Zubereitung, gekennzeichnet durch einen Gehalt an mindestens einer Verbindung der allgemei-
nen Formel I nach Anspruch 1 und/oder einem ihrer physiologisch unbedenklichen Salze.
- 25 7. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach Anspruch 1 oder von deren physiologisch unbedenklichen Sal-
zen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Bekämpfung von Krankheiten.
- 30 8. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach Anspruch 1 oder deren physiologisch unbedenklichen Salzen bei
der Bekämpfung von Krankheiten.
- 35 9. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach Anspruch 1 zur Herstellung von immobilisierten Liganden für
Affinitätssäulenchromatographie.
- 40 10. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach Anspruch 1 zur Reinigung von Integrinen durch Affinitätschro-
matographie.

30

35

40

45

50

55

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 770 622 A3

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(88) Veröffentlichungstag A3:
02.07.1997 Patentblatt 1997/27

(51) Int. Cl.⁶: C07K 7/64, A61K 38/04

(43) Veröffentlichungstag A2:
02.05.1997 Patentblatt 1997/18

(21) Anmeldenummer: 96113972.2

(22) Anmeldetag: 31.08.1996

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU NL
PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
LT LV SI

(30) Priorität: 15.09.1995 DE 19534177

(71) Anmelder: MERCK PATENT GmbH
64293 Darmstadt (DE)

(72) Erfinder:
• Jonczyk, Alfred, Dr.
64295 Darmstadt (DE)

- Goodman, Simon, Dr.
64287 Darmstadt (DE)
- Diefenbach, Beate, Dr.
64289 Darmstadt (DE)
- Sutter, Arne, Dr.
64297 Darmstadt (DE)
- Hölzmann, Günter, Dr.
64342 Seeheim (DE)
- Kessler, Horst, Prof.
85748 Garching (DE)
- Dechantsreiter, Michael
85748 Garching (DE)

(54) Cyclische Adhäsionsinhibitoren

(57) Die Erfindung betrifft neue Cyclopeptide der Formel Cyclo-(nArg-nGly-nAsp-nD-nE) worin

D und E jeweils unabhängig voneinander Gly, Ala, β -Ala, Asn, Asp, Asp(OR), Arg, Cha, Cys, Gln, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Lys(Ac), Lys(AcNH₂), Lys(AcSH), Met, Nal, Nle, Orn, Phe, 4-Hal-Phe, homoPhe, Phg, Pro, Pya, Ser, Thr, Tia, Tic, Trp, Tyr oder Val, wobei die genannten Aminosäurereste auch derivatisiert sein können,

optisch aktiver Aminosäuren und Aminosäurederivate handelt, sowohl die D- als auch die L-Formen eingeschlossen sind, sowie deren physiologisch unbedenklichen Salze.

Diese Verbindungen wirken als Integrin-Inhibitoren und können insbesondere zur Prophylaxe und Behandlung von Erkrankungen des Kreislaufs, angiogenen Erkrankungen, mikrobiellen Infektionen und in der Tumorer therapie verwendet werden.

R Alkyl mit 1-18 C-Atomen,

Hal F, Cl, Br, I,

Ac Alkanoyl mit 1-10 C-Atomen, Aroyl mit 7-11 C-Atomen oder Araalkanoyl mit 8-12 C-Atomen,

n keinen Substituenten oder einen Alkylrest R, Benzyl oder einen Aralkyl-Rest mit 7-18 C-Atomen an der alpha-Aminofunktion des entsprechenden Aminosäurerestes bedeuten, mit der Bedingung, daß mindestens ein Aminosäurerest über eine Substituenten n verfügt und wobei, sofern es sich um Reste

EP 0 770 622 A3

**UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE**

Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung den Vorschriften des europäischen Patentübereinkommens so wenig, daß es nicht möglich ist, auf der Grundlage einiger Patentansprüche sinnvolle Ermittlungen über den Stand der Technik durchzuführen.

Vollständig recherchierte Patentansprüche:

Unvollständig recherchierte Patentansprüche:

Nicht recherchierte Patentansprüche:

Grund für die Beschränkung der Recherche:

BEMERKUNG: Obwohl Anspruch 8 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen Körpers bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und basierte sich auf die in der Anmeldung angeführten Effekten.